

HPLC 法测定注射用头孢孟多酯钠中有关物质

杜淑朋¹, 周天舒², 宋维锋³, 刘贵池¹, 丁立秀¹, 牛 锋^{4*}

1. 石药集团 中诺药业(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050000
2. 石药集团 中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050000
3. 华药集团 爱诺有限公司, 河北 石家庄 050000
4. 石药集团 恩必普药业有限公司, 河北 石家庄 050000

摘要: 目的 建立 HPLC 对注射用头孢孟多酯钠中有关物质进行测定的方法。方法 菲罗门 Luna C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1% 三乙胺溶液 (用磷酸调节 pH 值至 2.5) - 乙腈 (76 : 24), 体积流量为 1.5 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL。采用杂质对照品法外标法计算杂质 D, 采用加校正因子的主成分自身对照法计算杂质 A、E、C。结果 杂质 D 为主要降解产物, 定量限为 0.01%, 在 0.02~0.20 μg 与峰面积线性关系良好。杂质 A、E、C 的校正因子分别为 1.14、1.25、1.14, 检测限分别为 0.004%、0.02%、0.04%。结论 杂质 D、A、E、C 作为特定杂质应订入质量标准, 可以更好地控制注射用头孢孟多酯钠中有关物质。

关键词: 注射用头孢孟多酯钠; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)10-1204-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.10.005

Determination of related substances in Cefamandole Nafate for Injection by HPLC

DU Shu-peng¹, ZHOU Tian-shu², SONG Wei-feng³, LIU Gui-chi¹, DING Li-xiu¹, NIU Feng⁴

1. Shijiazhuang Pharmaceutical Group Zhongnuo Pharmaceutical (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China
2. Shijiazhuang Pharma Group Zhongqi Pharmaceutical technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China
3. North China Pharmaceutical Group Aino Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China
4. Shijiazhuang Pharma Group NBP Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of related substances in Cefamandole Nafate for injection. **Methods** HPLC method was adopted. The determination was performed on Phenomenex C₁₈ (2) column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase was 1% triethylamine solution (phosphoric acid adjusted pH to 2.5) - acetonitrile (76 : 24) at a flow rate of 1.5 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, the column temperature was at 40 °C, and the injection volume was 20 μL. Impurity D was determined by external standard method, and impurity A, E, and C were determined by principal component self control method with correction factor. **Results** Impurity D was the main degradation products, the quantitative limits was 0.01%, and there had good linearity in the ranges of 0.02 — 0.20 μg/mL. The correction factors of impurity A, E and C were 1.14, 1.25, and 1.14, respectively, and the detection limits were 0.004%, 0.02%, and 0.04%, respectively. **Conclusion** Impurity D, A, E, and C should be adopted into the quality standard as specific impurities which can better control the related substances in Cefamandole Nafate for injection.

Key words: Cefamandole Nafate for injection; related substance; HPLC

头孢孟多酯钠是一种注射用广谱头孢菌素, 由美国礼来公司开发成功, 于 1977 年首先在南非上市, 于 1978 年在美国上市, 商品名 Mando, 被认为是一种高效安全的头孢菌素。有关物质研究作为药学研究的重中之重, 也是国家药品审评过程中较

为关注的一项重要技术指标^[1-4]。抗生素因制备工艺、化学结构及组分等方面的特殊性决定了其杂质引入途径、杂质谱构成等较一般小分子化学合成药更为复杂^[5]。因此, 建立良好、有效的有关物质检测方法在抗生素药物研发中非常必要。注射用头孢

收稿日期: 2015-07-02

作者简介: 杜淑朋, 女, 工程师, 研究方向为药物的质量研究。Tel: (0311) 83869270 E-mail: 492501941@qq.com

*通信作者 牛 锋, 男, 高级工程师, 博士, 研究方向: 药剂学。Tel: (0311) 66693707 E-mail: niufeng0828@yahoo.com.cn

孟多酯钠中有关物质研究在《中国药典》2010年版二部中只规定了单杂和总杂质的限度分别为1.0%、3.0%^[6]；在《英国药典》中纳入了4个已知杂质^[7]，分别为5-巯基-1-甲基四氮唑（杂质D）、(R)-O-甲酰扁桃酰基-7-去乙酰氧基头孢烯酸（杂质A）、(R)-O-乙酰头孢孟多酯（杂质C）、(R)-O-甲酰扁桃酰基-7-乙酰氧基头孢烯酸（杂质E）。本实验参照现有标准^[6-7]建立了头孢孟多酯钠中有关物质的检测方法，并对《英国药典》中纳入的4个已知杂质（结构式见图1）进行了分析，通过对不同厂家产品中杂质情况对比，制定了杂质的限度。结果证明所制定方法合理有效，重复性好，准确度高。

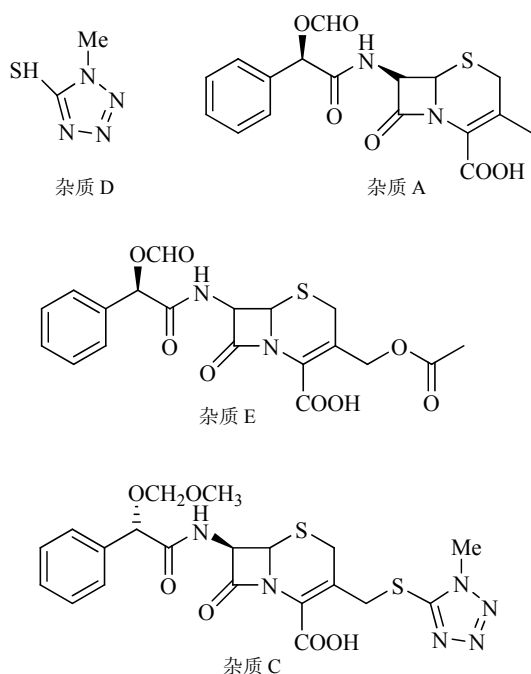


图1 有关物质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of related substances

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪；XA205型电子分析天平。

注射用头孢孟多酯钠分别为批号110312，规格2.0 g，自制；批号20131201，规格1.0 g，南京海辰药业股份有限公司；批号K1308102，规格2.0 g，华北制药河北华民制药有限责任公司；批号130222，规格1.0 g，政德制药股份有限公司。头孢孟多酯钠原料（批号20004LJ86H-C）由齐鲁安替制药有限公司提供。杂质A（质量分数96.5%）、杂质C（质量分数94.5%）、杂质E（质量分数85.9%）对照品均为自制；杂质D对照品（质量分数98.5%）由北京百灵威科技有限公司提供；头孢孟多酯（质

量分数88.2%）由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

菲罗门 Luna C₁₈(2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相为1%三乙胺溶液（用磷酸调节 pH 值至2.5）- 乙腈(76:24)，体积流量为1.5 mL/min，检测波长为254 nm，柱温为40℃，进样量为20 μL。

2.2 专属性试验

样品约25 mg置50 mL量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，置80℃水浴中1 h，即得高温破坏溶液。样品约25 mg置50 mL量瓶中，加双氧水2滴，放置10 min后，加流动相溶解并稀释至刻度，即得H₂O₂破坏溶液。样品约25 mg置50 mL量瓶中，加0.1 mol/L HCl溶液5 mL，放置10 min，加0.1 mol/L NaOH溶液5 mL中和，加流动相溶解并稀释至刻度，即得HCl破坏溶液。样品约25 mg，置50 mL量瓶中，加0.1 mol/L NaOH溶液5 mL，放置10 min，加0.1 mol/L HCl溶液5 mL中和，加流动相溶解并稀释至刻度，即得NaOH破坏溶液。取各溶液进样测定，结果见图2。从破坏试验的结果可知，在制定的色谱条件下，新产生的杂质均能有效分离，对特定杂质的检测不会产生影响。

2.3 特定杂质的分离定位试验

取杂质D、A、E对照品和样品，配制成含杂质D对照品1.0%，杂质A、E分别为0.5%的供试品溶液，对杂质A和杂质E进行定位，考察限量下的分离度符合规定。见图3。

2.4 杂质D的测定

2.4.1 对照品溶液的制备 取杂质D对照品10 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀。精密量取5 mL，置100 mL量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.2 供试品溶液的制备 取本品25 mg置50 mL量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品溶液。

2.4.3 线性关系考察 取杂质D对照品约10 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀。取上述溶液1、2、4、5、6、10 mL，分别置100 mL量瓶中，加流动相至刻度。精密取20 μL，注入色谱仪，记录色谱图。以进样质量为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得线性方程 $Y=41\ 812\ X+236.73$ ， $r=0.999\ 9$ ，结果表明杂质D在0.02~0.20 μg与峰面积线性关系良好。

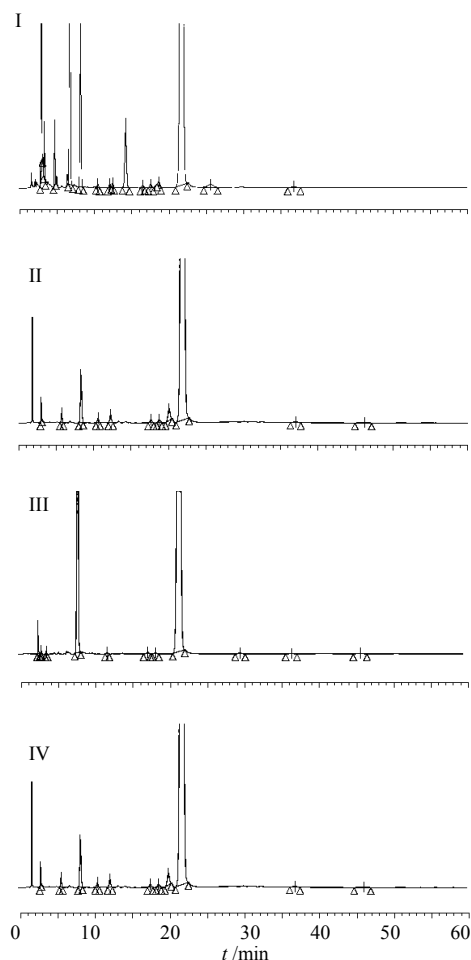


图2 高温破坏(I)、H₂O₂破坏(II)、HCl破坏(III)和NaOH破坏(IV)所得HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of destroyed by high temperature (I), H₂O₂ solution (II), HCl solution (III), and NaOH solution (IV)

2.4.4 定量限测定 取“线性关系考察”中最小质量浓度溶液5 mL, 置100 mL量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。精密量取20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图。当质量浓度为0.05 μg/mL时, 计算信

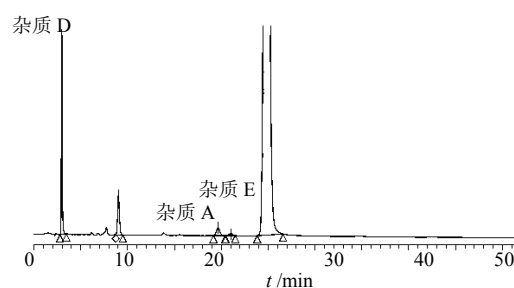


图3 特定杂质定位的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of localization of specific impurities

噪比S/N≈10。连续进样6次, 计算进样精密度RSD值≤5.0%。计算定量限为0.01%。

2.4.5 精密度试验 取杂质D对照品适量, 加流动相溶解并稀释成0.01 mg/mL的溶液。精密量取20 μL, 注入色谱仪, 连续进样6次, 记录色谱图, 计算得其峰面积的RSD值为0.52%。

2.4.6 稳定性试验 取0.01 mg/mL杂质D对照品溶液, 精密量取20 μL, 分别在0、2、4、8 h注入色谱仪, 记录色谱图, 计算得其峰面积的RSD值为1.31%, 表明溶液在8 h之内稳定。

2.4.7 回收率试验 取杂质D对照品约10 mg, 精密称定, 置100 mL量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。另取自制样品9份, 各约50 mg, 精密称定, 分置100 mL量瓶中, 再各加入对照品贮备液4、5、6 mL, 各3份, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图, 计算得平均回收率为101.80%, RSD值为0.87%。

2.4.8 测定方法 杂质D为主要降解产物, 采用杂质对照品法外标法进行定量计算, 结果见表1。杂质D峰与主成分峰的相对保留时间约为0.14。结果见表1。

表1 不同厂家注射用头孢孟多酯钠中有关物质的检测结果

Table 1 Results of related substances in Cefamandole Nafate for injection from different manufacturer

样品	杂质D/%	杂质A/%	杂质E/%	杂质C/%	其他最大单杂/%	杂质之和/%
自制	0.24	0.11	0.05	0.10	0.06	0.73
海辰药业	0.23	0.15	0.05	—	0.10	0.97
华民制药	0.07	0.31	—	0.04	0.06	0.48
政德制药	0.60	0.11	—	—	0.07	0.88
原料	0.05	0.12	0.07	0.08	0.05	0.54

2.5 杂质 A、E、C 的测定

2.5.1 线性试验及校正因子 取杂质 A、E、C 对照品及头孢孟多酯对照品各约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 制成各约含 0.1 mg/mL 的溶液。精密量取上述溶液 1、2、3、4、5、6 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度。精密量取上述溶液 20 μ L, 注入色谱仪, 记录色谱图。以质量浓度为自变量, 峰面积为因变量, 进行线性回归, 各成分的线性方程及相关系数见表 2。根据线性方程斜率, 计算得杂质 A、E、C 的校正因子分别为 1.14、1.25、1.14。

表 2 线性方程和相关系数

Table 1 Linear equation and correlation coefficient

名称	线性方程	相关系数 r
杂质 A	$Y=12\ 132\ X+258.73$	0.999 9
杂质 E	$Y=11\ 070\ X+925.87$	0.999 7
杂质 C	$Y=12\ 065\ X+647.87$	0.999 9
头孢孟多酯	$Y=13\ 797\ X+957.07$	0.999 7

2.5.2 检测限测定 取线性试验下最小浓度溶液, 逐级稀释, 当杂质 A 质量浓度为 0.02 μ g/mL 时, 信噪比 $S/N \approx 3$, 计算杂质 A 检测限为 0.004%; 当杂质 E 质量浓度为 0.1 μ g/mL 时, 信噪比 $S/N \approx 3$, 计算杂质 E 检测限为 0.02%; 当杂质 C 质量浓度为 0.2 μ g/mL 时, 信噪比 $S/N \approx 3$, 计算杂质 C 检测限为 0.04%。

2.5.3 测定方法 杂质 A、E、C 与主成分峰的相对保留时间分别为 0.81、0.84、1.38。采用加校正因子的主成分自身对照法计算, 结果见表 1。

2.6 不同厂家样品有关物质的比较

根据实测结果判断, 杂质 D 为主要杂质。华北制药河北华民制药有限责任公司产品杂质 A 为主要

杂质, 考虑其原因应为生产工艺不同而产生的结果。杂质 E 和 C 的含量均较低。

3 讨论

通过对杂质的来源分析及破坏试验的结果, 确定杂质 D 为主要降解杂质, 在《中国药典》中规定注射用头孢孟多酯钠中有关物质按自身对照法计算单杂和总杂的量, 不能直观、准确的了解杂质 D 的变化情况。本实验采用对照品的外标法计算杂质 D 的量, 将其作为特定杂质订入了质量标准, 限度为不得过 1.0%。对不同厂家样品中有关物质检测结果可见, 样品中均含有杂质 A、E、C, 也将其作为特定杂质订入质量标准。杂质 A、E、C 对照品不易获得, 实验对其校正因子进行了测定, 分别为 1.14、1.25、1.14, 采用加校正因子的主成分自身对照法计算其含量, 限度定为不超过 0.5%。用此种方法进行有关物质的控制比《中国药典》二部中的规定更为科学、严谨, 能更好地控制产品的质量。较《英国药典》中的自身对照法, 杂质 A、E、C 的控制更为严格。杂质 D 作为头孢类抗生素药品中的主要降解产物, 用外标法计算其含量, 更为准确、科学。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 附录 204-206.
- [2] 谢沐风, 罗霞萍, 陈亚美. 如何建立 HPLC 法测定有关物质的方法 [J]. 中国药品标准, 2002, 3(6): 326-328.
- [3] 张玉琥. 仿制药有关物质研究的特点及研究思路 [J]. 中国执业药师, 2009, 6(8): 31-34.
- [4] 余振喜, 庾莉菊, 黄海伟, 等. 浅谈 HPLC 法测定有关物质时已知杂质的计算方法 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(4): 278-282.
- [5] 张哲峰. 杂质谱分析是抗生素杂质控制的关键环节 [N]. 中国医药报, 2015-05-12(A06).
- [6] 中国药典 [S]. 第一增补本. 2010: 341-342.
- [7] 英国药典 [S]. 2013: 1402.